

FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES CON LACTOFERRINA BOVINA

Fiorela Ghilini, Diego E. Pissinis, Alejandro Miñán, Patricia L. Schilardi

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, UNLP-CONICET), Diag. 113 y 64, sn, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

nienna.gh@gmail.com

RESUMEN: Con el objetivo de producir materiales biológicamente activos y biocompatibles para inhibir y combatir el crecimiento bacteriano en dispositivos implantables, se modificaron superficies de Ti con lactoferrina, una proteína con capacidad antibacteriana comprobada, y además se funcionalizaron con esta proteína nanopartículas de plata previamente estudiadas por su efecto antimicrobiano. Las superficies logradas se caracterizaron con diferentes técnicas fisicoquímicas como UV-Visible, FTIR, DLS y AFM. Se están realizando los ensayos microbiológicos correspondientes para evaluar la capacidad bactericida de estos sistemas, con resultados preliminares prometedores.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas, lactoferrina, biomateriales

Debido a la gran variedad de enfermedades infecciosas causadas por diferentes tipos de bacterias patógenas, y la creciente resistencia a antibióticos, ha surgido durante los últimos años el interés por encontrar nuevas estrategias para evitar el desarrollo de resistencia microbiana. En este contexto, tanto las nanopartículas metálicas (NPs) como diferentes moléculas de origen natural, tales como ciertas proteínas, han logrado establecerse como los agentes más prometedores, exhibiendo un amplio espectro de actividad antibacteriana [1].

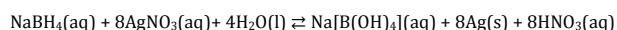
La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína multifuncional que presenta la capacidad de unir hierro, ya que una de las funciones primordiales de esta proteína es el transporte de metales. También actúa como proteína de defensa no específica, encontrándose en diversas secreciones mucosas como la leche, las lágrimas y la saliva [2]. Asimismo, es un componente abundante de los neutrófilos y puede ser liberada al plasma sanguíneo por la acción de éstos. Las lactoferrinas humana y bovina despliegan un amplio espectro antimicrobiano, actuando contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y contra algunos virus y hongos [3].

Por su parte, nanopartículas de distintos metales como cobre, zinc, titanio, oro, magnesio, y plata han mostrado actividad antibacteriana [1]. Sin embargo, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las más efectivas y presentan mayor actividad contra bacterias, virus y hongos, aunque su mecanismo de acción no está totalmente dilucidado aún. [4]. Un aspecto importante de las AgNPs es que mantienen su potencial bactericida cuando se las incluye en algunas preparaciones, tales como cremas, materiales de uso médico, gasas embebidas, o inmovilizadas en superficies de dispositivos implantables, por lo que poseen un considerable potencial como agentes antimicrobianos alternativos [5].

El objetivo de este trabajo es el diseño de superficies funcionalizadas con biomoléculas biocompatibles combinadas con AgNPs, capaces de inhibir el crecimiento y proliferación de bacterias. Como sustrato de interés se eligió Ti, ampliamente utilizado en implantes dentales y ortopédicos. Para este fin se estudiaron los siguientes sistemas: AgNPs inmovilizadas sobre Ti, superficies de Ti funcionalizadas con Lf, y AgNPs funcionalizadas con Lf. Para cada uno de los sistemas antes mencionados se realizaron ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando como modelo *Staphylococcus aureus*.

Sustratos. Se utilizaron discos de Ti de 7 mm de diámetro (99.7%, 0.25mm de espesor, de Johnson-Matthey) pulidos a grado especular con pasta de diamante.

AgNPs. Se sintetizaron por reducción de AgNO₃ con NaBH₄ y Na₃C₃H₅O(COO)₃ como estabilizante de la superficie de las nanopartículas.[6]



Para la caracterización se utilizaron técnicas de espectrometría UV-Visible, Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y espectroscopia infrarroja FTIR.

Funcionalización de Titanio con Lf. Se sumergieron sustratos de titanio pulidos en una suspensión de Lf 1mg/ml en buffer fosfato salino (PBS) durante 24 hs y luego de este tiempo los mismos se retiraron y lavaron con agua MilliQ. Las superficies obtenidas fueron caracterizadas mediante medidas de ángulo de contacto, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y microscopía de fuerzas atómicas (AFM).

Medida de ángulo de contacto. Las propiedades hidrofílicas de las superficies estudiadas se analizaron mediante la medida del ángulo de contacto sobre discos de Ti funcionalizados con Lf y sin funcionalizar utilizando para ello un goniómetro Ramé-Hart Model 290 U1 Series. La medida consiste en depositar una gota de agua MilliQ de 2.5 µl sobre la superficie problema y mediante el software DROPImage medir el ángulo de contacto generado en la interface líquido-aire-superficie. Las medidas se realizaron por triplicado y se compararon respecto al control de Ti sin funcionalizar.

Análisis por FTIR. Los espectros se llevaron a cabo con un espectrómetro Varian 660 utilizando el accesorio de reflexión total atenuada ATR (MIRacle ATR, Pike technologies) y un prisma de ZnSe. En todos los casos, cada espectro se obtuvo con 120 escaneos tomados con una resolución de 2cm⁻¹.

AFM. Se tomaron imágenes de los sustratos en modo de contacto intermitente, con una celda para líquidos utilizando un microscopio

Nanoscope unidad de control V de Veeco Instruments (Santa Barbara, CA, USA).

Funcionalización de AgNPs con Lf. Se pesaron 0.5 mg de Lf y luego se disolvieron en 1 ml de dispersión de AgNPs de 60 nm utilizando vórtex para homogeneizar. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 24 hs a 4°C. Transcurrido este tiempo se continuó con la purificación de las nanopartículas funcionalizadas mediante centrifugación de las mismas a 14 mil rpm durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se retiró y se reservó para posterior análisis mientras que el pellet de nanopartículas se resuspendió en una solución 1.25×10^{-3} de citrato de sodio para mantener la estabilidad de la dispersión. Se procedió a una nueva centrifugación siguiendo la metodología anterior para extraer la mayor cantidad de lactoferrina disuelta no unida a las AgNPs. En simultáneo se realizó el mismo experimento utilizando un volumen igual de nanopartículas solas a modo de control metodológico.

Con el objetivo de verificar la presencia de proteína en el sobrenadante se realizó un ensayo de Bradford en microplaca. El mismo consiste en colocar 250 µl del reactivo de Bradford y mezclarlo con 5 µl de la muestra a analizar. Al cabo de unos segundos si hay proteína el color cambiará hacia el azul, aumentando la intensidad con la concentración de proteína. El reactivo de Bradford es un colorante (Coomassie Brilliant Blue) que tiene un color rojizo (465nm) y reacciona con aminoácidos específicos y estructuras terciarias de la proteína formando un complejo color azul (595nm). La afinidad del colorante por la proteína es muy alta y permite detectar concentraciones del orden de los microgramos. [7]

Caracterización de las nanopartículas obtenidas:

Espectroscopía UV-Visible. Se obtuvieron los espectros de las dispersiones de nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar luego de la purificación y también de los sobrenadantes de las diferentes etapas de purificación para evaluar la evolución del método empleado. Nanopartículas de diferentes formas y tamaños producen distinta resonancia de plasmones y, en consecuencia, absorben en diferentes longitudes de ondas. De esta manera es posible observar si ocurren cambios en la morfología de las AgNPs al funcionalizarse. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible Lambda 35 de doble haz de Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) utilizando celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico.

Determinación del tamaño de nanopartículas por DLS. 1 ml de las dispersiones de AgNPs funcionalizadas y sin funcionalizar respectivamente, fueron evaluadas para medir el tamaño promedio mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS, con celdas DTS0012 para solventes acuosos.

Análisis por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Se utilizó esta técnica para comprobar la unión de la proteína a las nanopartículas de plata. Se colectaron los espectros de las dispersiones de AgNPs funcionalizadas y sin funcionalizar en citrato. Además fueron analizados los sobrenadantes del proceso de purificación que contienen Lf disuelta o nanopartículas, dejando secar gotas de solución en una superficie para luego medir por ATR. Estos ensayos se llevaron a cabo con un espectrómetro Varian 660 utilizando el accesorio de reflexión total atenuada ATR (MIRacle ATR, Pike Technologies) y un prisma de ZnSe. En todos los casos, cada espectro se obtuvo con 120 escaneos tomados con una resolución de 2cm^{-1} .

Sustratos de Ti modificados con Lf

Angulo de contacto. Los resultados muestran una disminución del ángulo de contacto cuando el sustrato se modifica con la proteína, lo cual es coherente ya que la misma presenta características hidrofílicas que son transferidas a la superficie.

Tabla 1. Medidas de ángulo de contacto para Ti solo y Ti funcionalizado con Lf

Muestra	Ángulo de Contacto (promedio \pm SD)
Ti	69,25 \pm 4,72 a
Ti-Lf1	45,76 \pm 2,80 b

Espectros FTIR. Se obtuvieron espectros IR de Ti modificado con Lf por 24 hs (Fig. 1) en los que se ven picos en la zona correspondiente a vibraciones del grupo N-H presentes en la proteína a 1650cm^{-1}

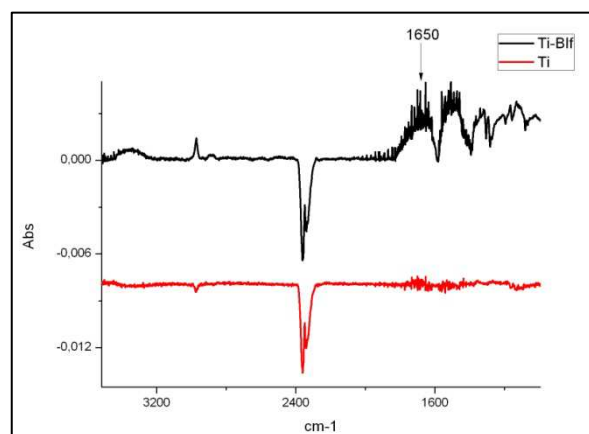


Fig 1. Espectros FTIR: Ti funcionalizado con Lf (negro) y Ti sin funcionalizar (rojo). El pico a 1650cm^{-1} indica la presencia de proteína en la superficie.

AFM. En la figura 2 se puede observar la proteína adsorbida en la superficie del Ti como pequeños puntos más claros. También se ven algunas zonas donde hay aglomeraciones de proteína. Estos resultados indican que la Lf es capaz de adsorberse en la superficie del Ti

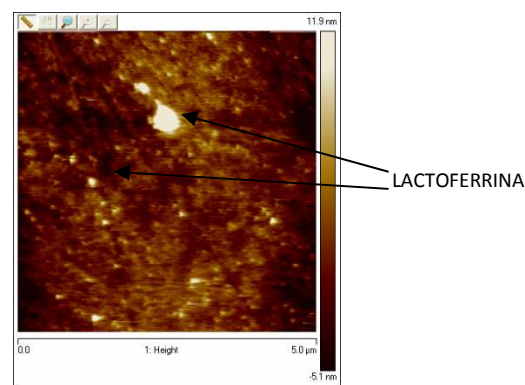


Fig2: Imagen AFM de Lf sobre Ti en medio líquido.

AgNPs funcionalizadas con Lf

Espectroscopía UV-Visible. En la Figura 3 se muestran los espectros de la nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar luego del proceso de purificación. Se observa un claro corrimiento en el máximo de

absorbancia hacia el rojo, indicando un cambio en el entorno de las nanopartículas.

Dispersión Dinámica de Luz. Los gráficos obtenidos (Figura 4) muestran un aumento en el tamaño de las AgNPs cuando son funcionalizadas con la proteína. Se encontró una diferencia de unos 20-30 nm en promedio, lo cual es consistente con el tamaño de la proteína (10 nm)

Espectros FTIR. El análisis de las diferentes muestras se muestra en la Figura 5, en la que puede observarse la aparición de un pico en los 1630 cm^{-1} en el espectro de las nanopartículas funcionalizadas que no se encuentra en los espectros de AgNPs, por lo que permite identificar la presencia de Lf en las AgNPs.

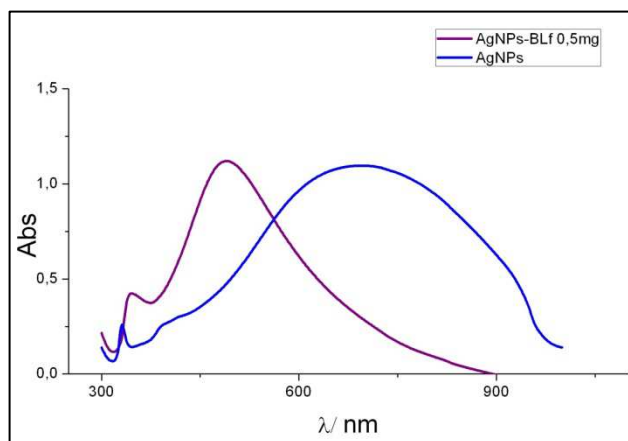


Fig 3. Absorbancia vs. longitud de onda para las diferentes dispersiones de AgNPs estudiadas.

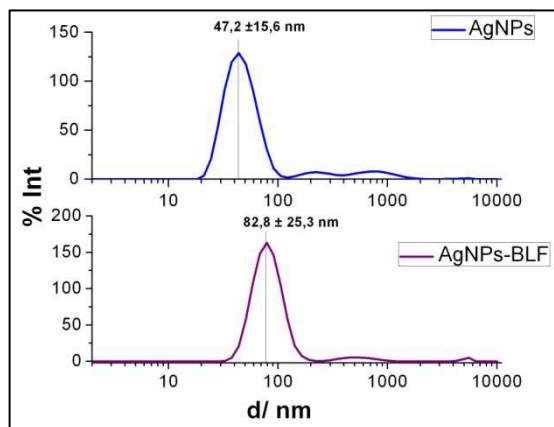
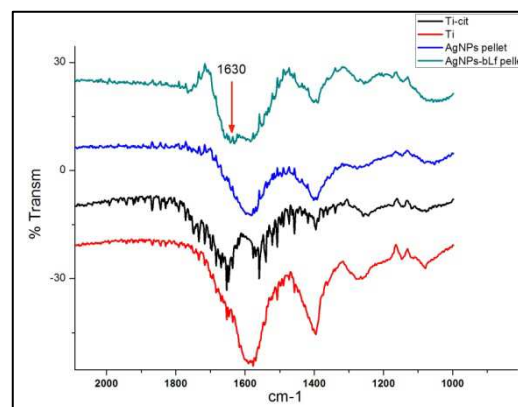


Fig. 4. Gráficos del % de intensidad vs diámetro promedio de partículas obtenidos por DLS a partir de 1 ml de dispersión de AgNPs funcionalizadas y sin funcionalizar, respectivamente.

Fig 5. Espectros FTIR de AgNPs y AgNPs funcionalizadas comparadas con un control de Ti, que es la superficie utilizada como soporte de las NPs.



Se logró diseñar con éxito un método de funcionalización de superficies de Ti y de AgNPs con Lf. Estos sistemas fueron analizados desde el punto de vista fisicoquímico con diferentes técnicas lográndose su caracterización. Se están realizando los ensayos microbiológicos correspondientes para evaluar la capacidad bactericida de estos sistemas, con resultados preliminares prometedores.

REFERENCIAS

- [1] J. Cruz, "Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de lactoferrina con potencial antibiótico contra Escherichi coli O157:H7," 2012.
- [2] D. A. Rodríguez-Franco, L. Vázquez-Moreno, and G. Ramos-Clamont Montfort, "Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales," *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, no. 3-4, pp. 102-111, 2005.
- [3] E. D. Weinberg, "Antibiotic properties and applications of lactoferrin," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 13, no. 8, pp. 801-811, 2007.
- [4] S. Mohanty, S. Mishra, P. Jena, B. Jacob, B. Sarkar, and A. Sonawane, "An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 8, no. 6, pp. 916-924, 2012.
- [5] M. Guzman, J. Dille, and S. Godet, "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 8, no. 1, pp. 37-45, 2012.
- [6] A. J. Frank, N. Cathcart, K. E. Maly, and V. Kitaev, "Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties: A first-year undergraduate experiment exploring plasmonic nanoparticles," *J. Chem. Educ.*, vol. 87, no. 10, pp. 1098-1101, 2010.
- [7] H. García and R. Vázquez, "Cuantificación De Proteínas: Una Revisión," *Bio Tecnología*, vol. 3, pp. 78-87, 1998.